

Predlagam dva sistema za nadzorovano hitro aktivacijo tarčnega proteina s pomočjo ultrazvoka. Prvi sistem deluje preko povezovanja dveh nefunkcionalnih proteinskih domen (split protein) v funkcionalno enoto s pomočjo proteinskih vijačnic (coiled coil). Drugi sistem nadzoruje aktivnost proteina preko transkripcije s pomočjo split dCas9 proteinov, na katere bi vezali aktivatorsko regijo. Sistemase lahko uporabljata ločeno ali v kombinaciji.

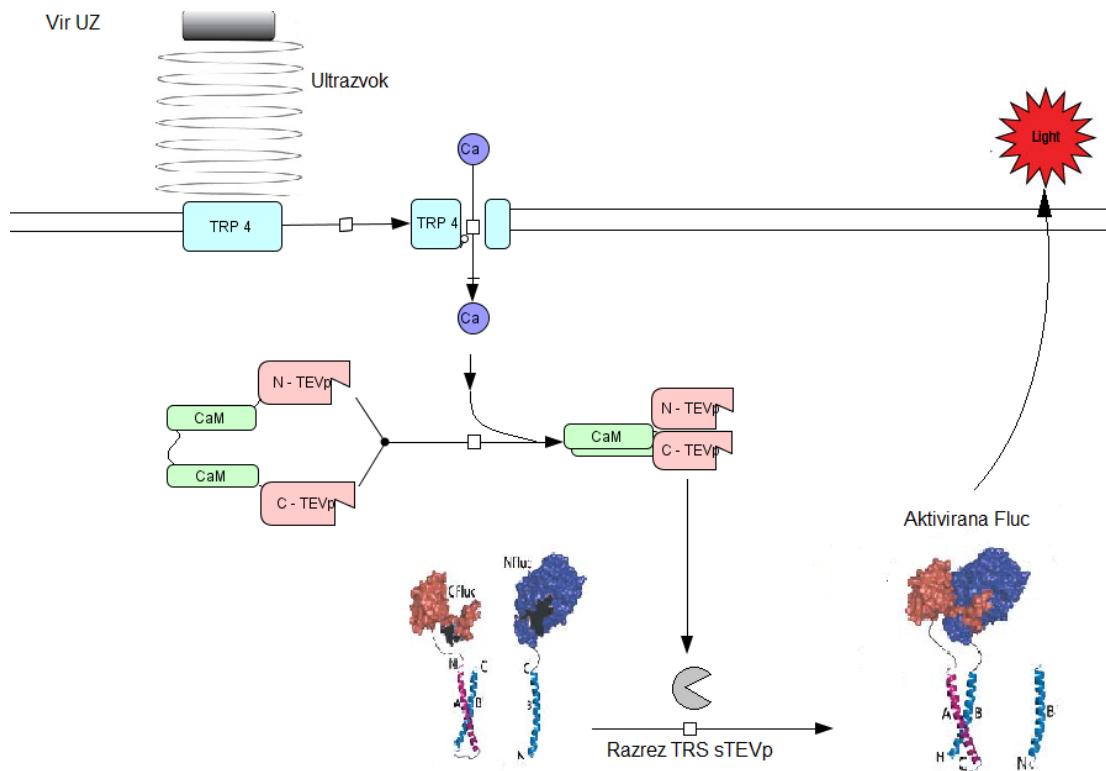
Ultrazvok (UZ) predstavlja neinvaziven, varen ter dobro nadzorljiv signal, ki je sposoben prodreti v globlja tkiva brez izgube jakosti<sup>1</sup>. Raziskovalna skupina Ibsen in sod. je identificirala membranski mehanoreceptor in ionski kanal TRP-4, ki je odziven na ultrazvočne signale. Ob obsevanju z nizkotlačnim ultrazvokom se kanalček odpre in spusti v citosol kalcijeve ione. Avtorji raziskave so prav tako pokazali, da vnos genov za TRP-4 naredi transgeni organizem občutljiv na ultrazvok<sup>1</sup>. Ojačanje občutljivosti na UZ signalso dosegli z dodajanjem mikroskopskih zračnih mehurčkov, ki so se ob obstreljevanju z UZ deformirali, združevali in razpadali. Številne bakterije in arheje so sposobne tvoriti mikroskopske mehurčke, z izražanjem genov za proteine, ki tvorijo ovoj mehurčka<sup>2,3</sup>. Tako ima cianobakterija *Anabaena flos-aquae* mehurčke sestavljene iz dveh proteinskih komponent, GVPa in GVPC<sup>2</sup>. Z vnosom genov za proteine ovoja mehurčka (GVPa, GVPC) v naš delavni organizem, bi lahko povečali občutljivost organizma na ultrazvok, brez potrebe po dodajanju mehurčkov.

Vdor kalcija v celico je možno pretvoriti v fiziološki odziv preko raznih proteinov, ki preidejo strukturne spremembe ob vezavi kalcija<sup>4</sup>. Eden takšnih proteinov je calmodulin<sup>5</sup>. Ob vezavi kalcija in tarčnega peptida (npr. peptidM13, ki je tarčna vezavna sekvenca na lahki verigi miozinske kinaze skeletnih mišic za calmodulin) se preoblikuje calmodulin v zaprto konformacijo<sup>6</sup>. Meister G. In Joshi N. sta kombinirala lastnost calmodulina, da ob vezavi kalcija spremeni svojo obliko iz odprte v zaprto, s tehnologijo fragmentiranih proteinov (split proteins). Pri metodi split proteins se funkcionalno aktiven protein razdeli na dve neaktivni domeni, ki se ob ponovni združitvi ponovno aktivirata. Z vnosom calmodulina med encim TEM1beta laktamazo sta avtorja razdelila encim na dve enoti, ki sta bili med sabo zadosti ločeni, da sta postali neaktivni. Ob prisotnosti kalcija je calmodulin spremenil konformacijo v zaprto obliko, s čimer sta enoti beta laktamaze prišli zadosti skupaj in tako ponovnoaktivirali encim<sup>7</sup>.

Obstaja mnogo proteinov, ki so uporabni za split protein tehnologijo<sup>8</sup>. Dobro raziskan primer proteaze je proteaza iz tobačnega virusa (TEVp), ki je že bila uporabljena za split protein tehnologijo, z dimerizacijo doseženo preko kemičnih induktorjev dimerizacije (CID). TEVp je uporaben tudi zato, ker v človeškem proteomu ni sekvence, ki bi jo TEVp razrezala, zaradi česar lahko dosežemo specifični razrez samo v vnešenih motivih TEVp prepoznavne sekvence (TRS – TEVp substrate recognition sequence)<sup>3</sup>.

**Predlagana sprememba je, da bi dosegli ponovno dimerizacijo TEVp s pomočjo zgoraj opisanega calmodulin-M13 sistema, namesto s pomočjo CID. Na ta način bi delovanje proteaze lahko nadzorovali s pomočjo ultrazvoka.**

Aktivirana TEVp lahko nadalje aktivira druge split proteine preko razreza TRS. To se da doseči s strategijo auto inhibiranih alfa heliks vijačnic (coiled coil – CC), kjer na oba dela fragmentiranega proteina dodamo alfa heliks vijačnici, povezani preko povezovalne (linker) sekvence s TRS motivom. Ob aktivaciji TEVp ta odreže stran inhibitorno alfa vijačnico, kar omogoči povezavo dveh fragmentov v funkcionalno enoto preko prostih alfa vijačnic<sup>9</sup>.



**Slika 1: Shematski prikaz aktivacije encima (Fluc) preko obstreljevanja z ultrazvokom**

Preko CC združeni protein je lahko že končni produkt, kjer je aktivnost regulirana preko logičnih vrat s pomočjo proteaznega razreza TRS motiva. Drugi način prav tako koristi strategijo auto inhibiranih CC na fragmentiranih proteinih, le da razdeljeni protein ne bi bil končni produkt, temveč Cas9 protein z odstranjeno nukleazno funkcijo (dCas9) ter dodano aktivatorsko domeno (npr. VPR). Cas9 se da uspešno razdeliti v dve neaktivni podenoti, ki ponovno pridobita aktivnost ob svoji združitvi. Prav tako je na ta način možno aktivirati izražanje tarčnih genov preko dodatka aktivatorske regije na dCas9<sup>10</sup>. Z variiranjem guide RNA sekvence bi bilo možno ciljati praktično vse regije v genomu. Prav tako bi bilo smiselno, glede na tarčno sekvenco, poskusiti kombinirati aktivacijo izražanja z demetilacijo (v primeru metilirane DNA na tarčni regiji), tako da bi na dCas9 poleg aktivatorja vezali še demetilazo.

Dosedanji poskusi so dosegli združitev razdeljenega Cas9 s pomočjo CID (rapamicina), zato je novi predlog poskusiti aktivirati razdeljeni dCas9 preko CC.

## Metode

Za delovne celice bi uporabili HEK 293 celice. Gene za vnešene proteine bi namnožili s PCR ter vnesli v plazmidne vektorje<sup>11</sup>. Za preverjanje uspešnosti metode, bi kot končni produkt (aktivirani protein) uporabili split luciferazo<sup>12</sup>, s čimer bi lahko preverjali odzivnost metode z merjenjem sproščene svetlobe. Mesto za vnos calmodulina med TEVp, mesta za razdelitev luciferaze ter mesto dodatka alfa heliks vijačnic bi določili iz že znane literature. Prav tako bi s pomočjo literature določili povezovalne strukture ter TRS<sup>3</sup> med segmenti konstruktov. Plazmide bi namnožili v DH5 $\alpha$  celicah ter jih nato izolirali s pomočjo izolacijskih kitov. Primernost sekvence bi preverjali s sekvenciranjem. Plazmide bi zmešali skupaj v transfekcijske mešanice, v katere bi zraven dodali še plazmid z yfp ali gfp, s čimer bi lahko preverjali uspešnost transfekcije s pomočjo qPCR ali z opazovanjem fluorescence pod mikroskopom. Pripravili bi tudi negativne kontrole brez vnešenih konstruktov in z vnešenim yfp/gfp plazmidom. Kot dodatne kontrole bi uporabili tudi plazmide z nedelujočimi proteazami in neprilegajočimi CC peptidi ter plazmid z aktivno (non-split) luciferazo za pozitivno kontrolo.

HEK celice bi 24h pred izvedbo transfekcije nacepili v zadostnem številu na plošče in jih inkubirali v inkubatorju na 37°C. Plazmide bi skupaj transfecirali v HEK 293 celice z dodatkom polietilenimina (PEI) transfekcijskim mešanicam in nato dodatkom transfekcijske mešanice s PEI k celicam. Po dveh dnevih bi izvedli poskus z obstreljevanjem celic z ultrazvokom<sup>1</sup>. Prisotnost mehurčkov bi preverili pod mikroskopom. V primeru slabe produkcije mehurčkov, bi te lahko posebej pripravili in jih dodali v gojišče<sup>1</sup>. Pred obstreljevanjem bi dodali k celicam luciferin, ki bi deloval kot substrat za skupaj sestavljeno luciferazo. Oddano svetlobo bi merili z luminometrom<sup>13</sup> v časovnih intervalih, z začetkom nekaj minut po obstreljevanju z ultrazvokom. Uspešnost metode bi določali s primerjanjem aktivacije split luciferaze s pozitivno kontrolo (non-split luciferazo). Rezultate bi prikazali kot aktivnost encima v časovnem obdobju, kjer bi lahko merili v kolikšnem času pride do odziva ter kdaj pride do najvišje aktivnosti.

Preverjanje aktivacije izražanja s dCas9:VPR bi prav tako lahko preverjali preko tarčnega izražanja gena za luciferazo. V tem primeru bi gen za (aktivno, non-split) luciferazo stabilno vnesli v HEK celice z virusno transdukcijo<sup>14</sup>, medtem ko bi preostale konstrukte vnesli v celice s transfekcijo plazmidnih vektorjev.

Metodo aktivacije bi lahko po poskusih s split luciferazo poskusili aplicirati tudi na druge encime, ki se jih da razdeliti na dve neaktivni enoti. Ob uspešnem delovanju bi naslednji korak lahko bil poskus doseči stabilno ekspresijo konstruktov v testnih živalih, na primer miškah. Na ta način bi lahko z vstavitvijo genov pod tkivno specifične promotorje dosegli občutljivost na ultrazvok samo v specifičnih celicah. Tak pristop bi omogočil hitro aktivacijo celičnih signalnih poti in drugih metabolnih procesov, brez časovnih zamikov. S tem bi lahko

raziskovali celične procese z zelo dobro določljivim časom aktivacije. Tak pristop bi praktično odstranil potrebo po invazivnih posegih v testni organizem, kot na primer pri podobnih optogenetskih metodah. S poznavanjem časa aktivacije proteina bi lahko bolj natančno določali delovanje in vlogo aktiviranega proteina v celici.

## Viri

1. Ibsen S, Tong A, Schutt C, Esener S, Chalasani SH. Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications*. 2015;6:8264.
2. Hayes K, Lazarus CM, Bees A Walker JE, Walsby AE. The protein encoded by *gvpC* is a minor component of gas vesicles isolated from the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis* sp. *Molecular Microbiology* (1988) 2(5), 545-552
3. Mlouka A, Comte K, Castets AM, Bouchier C, de Marsac NT. The Gas Vesicle Gene Cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA Rearrangements That Lead to Loss of Cell Buoyancy. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Apr. 2004, p. 2355–2365
4. Ye H, Aibel D, Fussenegger M. Synthetic mammalian gene circuits for biomedical applications. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2013;17(6):910-917.
5. Mank M, Griesbeck O. Genetically Encoded Calcium Indicators. *Chem. Rev.* 2008, 108, 1550–1564
6. Bayley PM, Findlay WA, Martin SR. Target recognition by calmodulin: Dissecting the kinetics and affinity of interaction using short peptide sequences. *Protein Science* (1996), 5:1215-1228.
7. Meister GE, Joshi NS. An engineered calmodulin-based allosteric switch for Peptide biosensing. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*. Aug 19 2013;14(12):1460-1467.
8. Shekhawat SS, Ghosh I. Split-protein systems: beyond binary protein-protein interactions. *Curr Opin Chem Biol*. Dec 2011;15(6):789-797.
9. Shekhawat SS, Porter JR, Sriprasad A, Ghosh I. An Autoinhibited Coiled-Coil Design Strategy for Split-Protein Protease Sensors. *J. AM. CHEM. SOC.* 2009, 131, 15284–15290
10. Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nature biotechnology*. Feb 2015;33(2):139-142.
11. Ye H, Daoud-El Baba M, Peng RW, Fussenegger M. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*. Jun 24 2011;332(6037):1565-1568.
12. Kato N, Jones J. The split luciferase complementation assay. *Methods in molecular biology*. 2010;655:359-376.
13. Lim E, Modi KD, Kim J. In vivo bioluminescent imaging of mammary tumors using IVIS spectrum. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2009(26).
14. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Aug 2010;397(8):3173-3178.